



日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

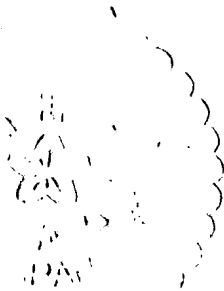
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 1 月 2 1 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 0 1 2 0 5 7
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 0 1 2 0 5 7]

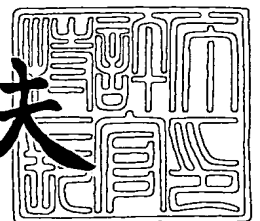
出 願 人 日 本 原 子 力 研 究 所
Applicant(s):



2 0 0 3 年 1 2 月 1 日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 030051

【提出日】 平成15年 1月21日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A01C 1/00

【発明者】

 【住所又は居所】 群馬県高崎市綿貫町 1 2 3 3 番地 日本原子力研究所
高崎研究所内

 【氏名】 久米 民和

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県那珂郡東海村白方字白根 2 番地の 4 日本原子力
研究所 東海研究所内

 【氏名】 竹下 英文

【発明者】

 【住所又は居所】 群馬県高崎市綿貫町 1 2 3 3 番地 日本原子力研究所
高崎研究所内

 【氏名】 藤巻 秀

【発明者】

 【住所又は居所】 新潟県新潟市五十嵐 2 の町 8 0 5 0 番地 新潟大学農学
部内

 【氏名】 大山 卓爾

【発明者】

 【住所又は居所】 新潟県新潟市五十嵐 2 の町 8 0 5 0 番地 新潟大学農学
部内

 【氏名】 大竹 憲邦

【特許出願人】

 【識別番号】 000004097

 【氏名又は名称】 日本原子力研究所

【代理人】**【識別番号】** 100089705**【住所又は居所】** 東京都千代田区大手町二丁目 2 番 1 号 新大手町ビル 2
0 6 区 ユアサハラ法律特許事務所**【弁理士】****【氏名又は名称】** 社本 一夫**【電話番号】** 03-3270-6641**【選任した代理人】****【識別番号】** 100076691**【弁理士】****【氏名又は名称】** 増井 忠弐**【選任した代理人】****【識別番号】** 100075270**【弁理士】****【氏名又は名称】** 小林 泰**【選任した代理人】****【識別番号】** 100080137**【弁理士】****【氏名又は名称】** 千葉 昭男**【選任した代理人】****【識別番号】** 100096013**【弁理士】****【氏名又は名称】** 富田 博行**【選任した代理人】****【識別番号】** 100092015**【弁理士】****【氏名又は名称】** 桜井 周矩

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 051806

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9706383

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 放射線処理を利用した植物への窒素固定菌着生促進法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 低エネルギーの電子線照射を特徴とする植物根への窒素固定菌の着生を高める方法。

【請求項 2】 電子線のエネルギーを制御することにより、植物根への窒素固定菌の着生を高めるのに適した線量を、植物組織の表層必要部位に照射することを特徴とする、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】 照射する電子線のエネルギーが100～500keVであることを特徴とする、請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】 照射する電子線の線量が10Gy～100kGyであることを特徴とする、請求項 1 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、マメ科植物など各種の植物種子あるいは植物体に、電子線のエネルギーを変えることにより照射深度を制御して必要線量の照射を行い、植物に傷害を引き起こすことなく植物根への窒素固定菌の着生を高める方法を提供するものである。

【0002】

【従来の技術】

土壌微生物の中には、大豆などのマメ科植物と共生して、根に根粒と呼ばれる器官を形成し、空中の窒素を固定して植物に与える根粒菌と呼ばれる細菌や、多くの植物の根に共生して根から離れた場所まで菌糸を伸ばすことにより養分吸収域を拡大してリン吸収を助けるカビの仲間の菌根菌、また、植物が利用しにくいリンや鉄等の養分などの溶解を促進する菌などのように植物の生育を直接助ける微生物がいる。これらの微生物を作物栽培に用いるバイオ肥料は、作物の収量を高めつつ化学肥料の使用量を低減することができるため、作物生産と環境保全の両立をはかることができる。とくに、植物根への窒素固定菌の着生を高めること

は、環境に悪影響を与えることなく作物生産を増大できる効果的な方法である。

【0003】

特に、大豆などのマメ科植物は、根に根粒とよばれるコブをつくり、その中に土壤微生物である根粒菌を飼い、空気中の窒素ガスをアンモニアに変換して自分の栄養としている。このように空気中の窒素ガスをアンモニアに変換することを窒素固定と呼ぶ。

【0004】

マメを栽培すると土が肥沃になることは古くから知られており、ヨーロッパの輪栽式農業では、休閑のかわりにクローバーなどのマメ科牧草が植えられ地力の向上が行われている。窒素固定を行う微生物は、細菌、放線菌、ラン藻など細胞核を持たない原核生物に限られるが、その中に植物と共生して窒素固定を行う菌がいる。共生的窒素固定としてはマメと根粒菌の関係が有名であるが、マメ科以外の植物でも荒地にはじめに進出するパイオニア植物であるハンノキ、ヤマモモ、モクマオウなどが放線菌と共生する根粒を形成して窒素固定を行う。また、ソテツはラン藻と共生する根粒を形成する。根粒以外にも、根の周りや根や茎などに住み着いて窒素を固定する内生菌（エンドファイト）と呼ばれる菌がおり、養分が少なくても旺盛に育つサトウキビの内性菌による窒素固定が注目されている。

【0005】

しかし、これらの菌の植物への着生は効率が悪く、人工培養した有効菌を大量に含むバイオ肥料の施肥などが行われている。そこで、より簡便で、より効率的な菌の着生法の確立が望まれる。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

上記の問題点に鑑み、本発明は、本来の植物の機能を損なうことなく植物根への菌の着生を高めて窒素固定などの栄養獲得を増大させることにより、化学肥料の使用量を減少させて環境保全に役立てるとともに、植物を効率的に生育させる方法を提供することを課題とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記の課題を解決すべく鋭意研究した結果、低エネルギーの電子線を用いることにより照射深度を調節し、植物の有する本来の機能を損なうことなく、種皮や植物体表面の細胞壁に適正線量を照射する手法を明らかにし、植物根への菌の着生を高める方法を開発した。

【0 0 0 8】**【発明の実施の形態】**

本発明は、電子線のエネルギーを変えて、植物の種子や植物体を照射する方法であり、植物種子の大きさ、細胞壁の厚さに応じて照射条件を変えることが可能である。したがって、どのような形態の種子や植物体でも処理が可能である。

【0 0 0 9】

本発明においては、主として低エネルギーの電子線を用いるが、透過力を制御できるイオンビームなどが含まれる。照射線量は、10Gy～100kGyの範囲であることが望ましい。最も望ましい線量は、植物の種類や照射条件によって異なるが、10kGy程度である。また本方法では、電子線の線量よりもそのエネルギーによる電子線の植物体への透過度が重要である。エネルギーが高すぎると被照射体への透過度は高く、植物体の生育機能に傷害を与えてしまう一方、エネルギーが低すぎると必要な部位への照射を行うことができない。したがって、本発明において、電子線のエネルギーは、10keV～1MeVが用いられるが、最も望ましいエネルギーは100keV～500keVである。

【0 0 1 0】

低エネルギーの電子線照射では、透過力が小さいため被照射体の表面全体に照射するためには被照射体を回転させながら照射する必要があるが、片面または反転照射によっても効果を発現させることができる。最も簡単な照射方法は、片面照射であるが、この場合の効果が両面あるいは回転均一照射の場合の効果と同等であることを確認することが望ましい。

【0 0 1 1】

以下、実施例によって本発明をさらに詳細に説明するが、本発明の範囲はそれら実施例のみによって限定されるものではない。

【0012】

【実施例】

低エネルギー電子線による線量は、電子線ウィンドウと被照射体の間の距離に強く依存するため、本実施例では被照射体の位置における線量をフィルム線量計を用いて直接測定した。

(実施例1)

ダイズ種子にエネルギーの異なる電子線を両面から10kGy照射した後、滅菌、播種し、9日間栽培した。培養した根粒菌密度を約 10^2 細胞/mlに希釈した薄い根粒菌懸濁液にこれらの植物体の根を浸し、根粒菌の接種を行った。その後、21日間栽培したのち、着生した根粒の数および根粒の総重量を計量した。この結果、対照区（非照射）のダイズの根には根粒の着生がほとんど認められなかったのに対し、照射区のダイズの根には統計的に明らかに多くの根粒の着生が認められた（表1、図1参照のこと）。また、根粒の総重量も、照射区で有意に増大していることが明らかとなった。

【0013】

【表1】

表1 電子線照射区および非照射区のダイズの根に着生した根粒の数および重量

(5個体の平均値、根粒菌液密度 10^6 細胞/ml)

	非照射区	照射区
平均着生数（個）	0.6	5.0
根粒の総重量（g）	0.01284	0.04502

【0014】

(実施例2)

実施例1に示したものと同様の条件で、培養した根粒菌液密度を 10^6 細胞/mlと高くした根粒菌懸濁液にこれらの植物体の根を浸し、根粒菌の接種を行った。この結果、非照射区、照射区ともダイズの根に多くの根粒の着生が認められ、照射区のダイズの根で根粒の着生が高い傾向が認められた（表2参照のこと）。しかし、わずかな増大であり、根粒菌の着生促進効果は接種菌数が少ないときにより顕著であることが分かった。

【0015】

【表2】

表2 電子線照射区および非照射区のダイズの根に着生した根粒の数および重量
(5個体の平均値、根粒菌液密度 10^6 細胞/ml)

	非照射区	照射区
平均着生数 (個)	22.6	25.8
根粒の総重量 (g)	0.08728	0.12196

【0016】

(実施例3)

実施例1と同様の条件でダイズ種子の照射を行った後、滅菌、播種し、9日間栽培した。得られた植物体を土壌に移し、グリーンハウス内で30日間栽培した後の着生根粒数を調べた。土壌中に存在している根粒菌の場合にも、照射区のダイズの根に明らかに多くの根粒が着生していることが認められた(表3参照のこと)。非照射区に比べ、照射区では約10倍の根粒菌の着生が認められ、照射による顕著な根粒菌着生効果が明らかとなった。

【0017】

【表3】

表3 電子線照射区および非照射区のダイズの根に着生した根粒の数および重量
(土壌中で30日間栽培)

	非照射区	照射区
着生数 (個)	12	194
	23	218

【0018】

(実施例4)

エネルギー200keVの電子線を用いて、ダイズの種子に20kGyまでの線量を照射したときの発芽率を計測した。水を含ませたろ紙上に置いた種子の2日後の発芽率は、図2に示すように2kGy～15kGyでわずかではあるが増大した。20kGyの照射ではわずかな減少が認められたが、顕著な差はなかった。従って、本発明で最も根粒菌の着生効果が高い10kGy程度の照射では発芽が損なわれることはなく、む

しろ促進される可能性があることが分かった。

(実施例 5)

実施例 4 と同様にエネルギー 200keV の電子線を用いて、ダイズの種子に 20kGy までの線量を照射し、バーミキュライトを用いて 2 週間栽培したときの生育高さを計測した。図 3 に示すように、非照射区に比べいずれの照射区でも植物の生育高さが増大しており、成長が阻害されることは無くむしろ促進効果が得られることが明らかとなった。

【0019】

以上のように、本発明による根粒菌着生促進法を用いることにより、自然の条件下で根粒菌の着生を効率良く高めることが可能である。また、本実施例では、非照射区と照射区の比較を行うため、播種前に種子の殺菌処理を行ったが、照射種子では表面殺菌されており、薬剤による殺菌処理は不要である。これは、本発明による根粒菌着生促進効果は、電子線照射による殺菌効果により競合菌がいなくなったためではなく、植物体そのものの変化による新たな根粒菌着生機構が働いていることを示しており、植物体と着生菌の相互作用を高める手法を提供するものである。

【0020】

【発明の効果】

一般に大豆の収穫量は根粒菌との共生的窒素固定に大きく依存しており、大豆の収穫量が低いのは根粒の活性を十分に活用できていないことが大きな原因である。根粒は、土壤微生物である根粒菌の大豆根への感染によって形成されるが、土壤中に根粒菌密度が低い圃場や、気象条件や栽培条件等によっては、根粒が十分着生せず低収量の原因になる。したがって、本発明による種子への電子線照射によれば、簡便かつ安価に圃場での根粒菌への感染を飛躍的に促進させ、大豆の安定多収に大きな貢献をすることが期待される。また、本発明は、人為的な根粒菌接種の接種効率と確実性を高める効能を有する全く新しい画期的な技術を提供するものである。

【図面の簡単な説明】

【図 1】 図 1 は、根粒着生に対する大豆種子への電子線照射の促進効果を表

す図である。

【図 2】 図 2 は、電子線（照射エネルギー：200keV）を照射した大豆種子の発芽率を表す図である。

【図 3】 図 3 は、電子線（照射エネルギー：200keV）を照射した大豆種子の播種 2 週間後の生育高さを表す図である。

【書類名】 図面

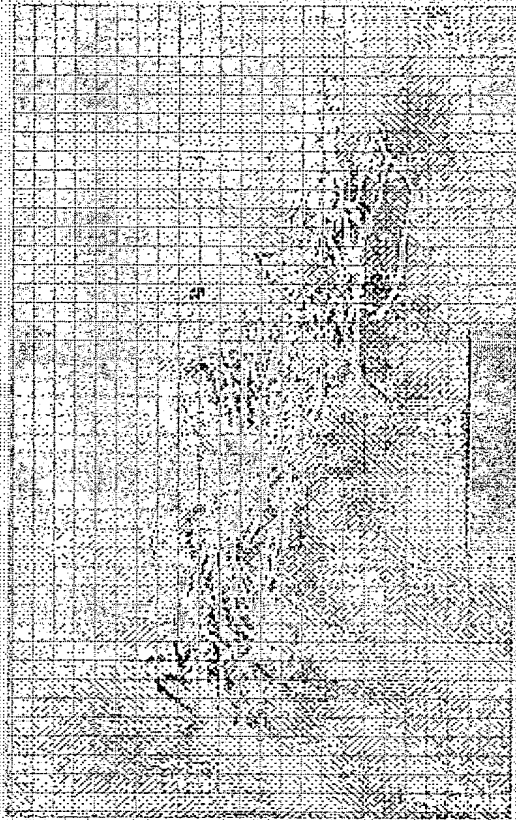
【図 1】

図 1 根粒着生に対する大豆種子への電子線照射の促進効果

根粒菌懸濁液密度: 10^2 cell/mL

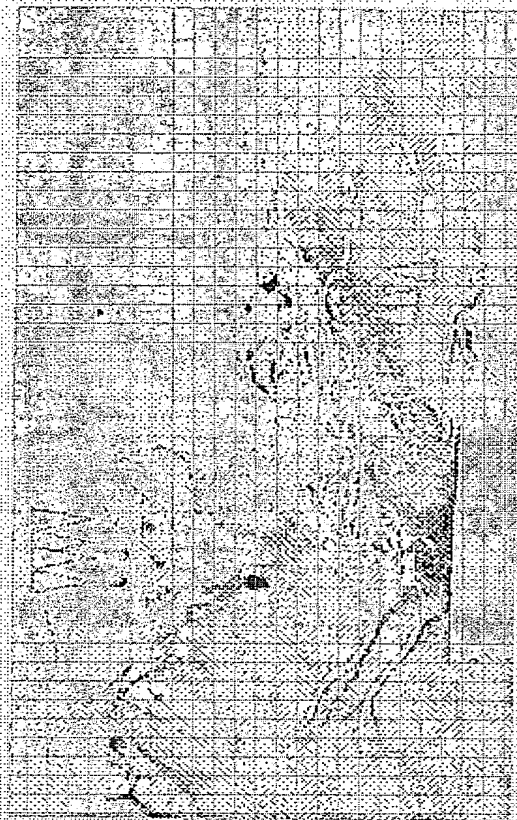
非照射区

照射区



根粒の着生数

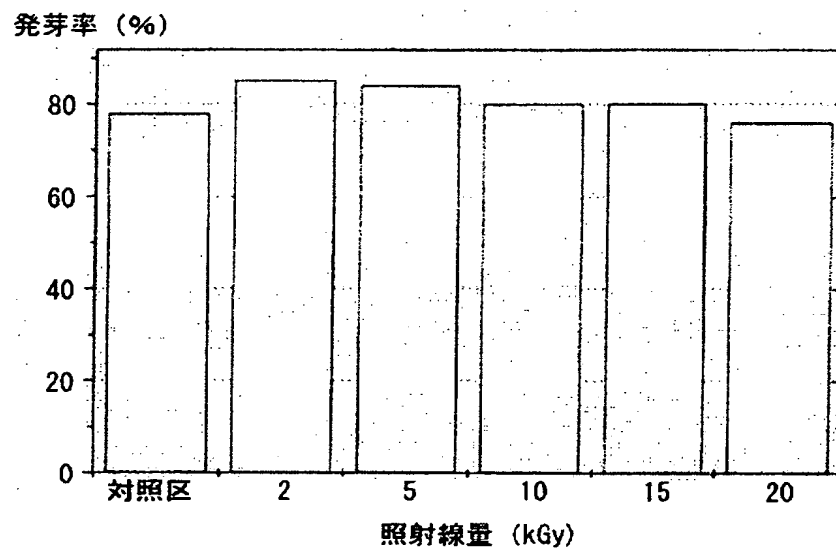
0 個



7 個

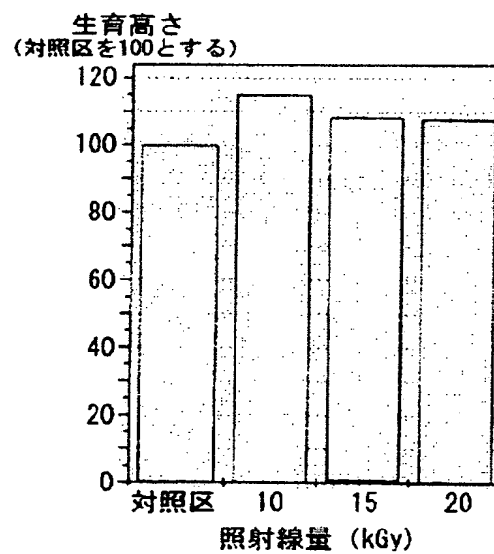
【図 2】

図 2 電子線（照射エネルギー：200 keV）を照射した大豆種子の発芽率



【図 3】

図 3 電子線（照射エネルギー：200 keV）を照射した大豆種子の播種 2 週間後の生育高さ



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明は、本来の植物の機能を損なうことなく植物根への菌の着生を高めて窒素固定などの栄養獲得を増大させることにより、化学肥料の使用量を減少させて環境保全に役立てるとともに、植物を効率的に生育させる方法を提供することを課題とする。

【解決手段】 低エネルギーの電子線照射を特徴とする植物根への窒素固定菌の着生を高める方法であって、電子線のエネルギーを制御することにより、植物根への窒素固定菌の着生を高めるのに適した線量を、植物組織の表層必要部位に照射することを特徴とする方法。

【選択図】 なし



特願 2 0 0 3 - 0 1 2 0 5 7

出 願 人 履 歷 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 4 0 9 7]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 1 6 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都千代田区内幸町 2 丁目 2 番 2 号

氏 名

日本原子力研究所

2. 変更年月日

2 0 0 3 年 1 月 2 7 日

[変更理由]

住所変更

住 所

千葉県柏市末広町 1 4 番 1 号

氏 名

日本原子力研究所